

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520584

(P2004-520584A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004. 7. 8)

(51) Int. Cl.⁷

F 1

テーマコード (参考)

G 0 1 N 21/35

G 0 1 N 21/35

Z

G 0 1 N 33/483

G 0 1 N 33/483

C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 64 頁)

(21) 出願番号 特願2002-557987 (P2002-557987)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月22日 (2002. 1. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年7月18日 (2003. 7. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/000589
 (87) 国際公開番号 W02002/057753
 (87) 国際公開日 平成14年7月25日 (2002. 7. 25)
 (31) 優先権主張番号 101 02 743. 5
 (32) 優先日 平成13年1月22日 (2001. 1. 22)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

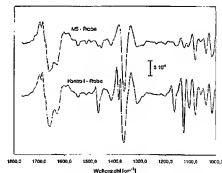
(71) 出願人 503259141
 ウルフ アンドレアス
 ドイツ国 インゲルハイム 55218
 イム ヘルステル 19
 (71) 出願人 503259152
 マシュエヒ ラルフ
 ドイツ国 フライブルク 79098 シ
 ユスターシュトラッセ 31
 (71) 出願人 503259163
 ザイデル ロバート
 ドイツ国 フライブルク 79110 ハ
 ウリベク 14
 (74) 代理人 100065215
 弁理士 三枝 英二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F T I R を使用しての生物学的物質についての迅速試験

(57) 【要約】

本発明は、生物学的流体のサンプルの I R スペクトルを記録することによって、生物学的流体の状態を測定するための方法に関する。これによって、生物学的流体をその真の形態で検査することが可能となる。本発明の方法は、例えば、生物における病理学的状態を検出するために使用され得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的流体のコンディションを決定するための方法であって、以下

(a) 該生物学的流体のいくつかの天然サンプルを提供する工程〔各場合における該生物学的流体のコンディションは既知である〕；

(b) 工程 (a) の天然サンプルの IR スペクトルを記録する工程；

(c) 工程 (b) の IR スペクトルをマルチパラメータ分析手順に供し、そして既知コンディションへの該サンプルの信頼性のある帰属を確実にする分類パラメータを選択する工程；

(d) 工程 (c) において得られた分類パラメータを保存する工程；

(e) そのコンディションが未知である生物学的流体の天然サンプルを提供する工程；

(f) 工程 (e) の天然サンプルの少なくとも 1 つの IR スペクトルを記録する工程；

(g) 工程 (f) の IR スペクトルをマルチパラメータ分析へ供する工程、および

(h) 該未知サンプルの IR スペクトルのコンディションパラメータを、工程 (d) において保存された該既知サンプルの IR スペクトルのコンディションパラメータと比較する工程、

〔ここで、工程 (b) および (f) における IR スペクトルは、 $3.0\text{ }\mu\text{m}$ 以下の路長 (path length) を有する測定セルの助けを借りて記録される〕

を包含する、方法。

【請求項 2】

生物学的流体のコンディションのコレクションを作製するための方法であって、以下

(a) 生物学的流体のいくつかの天然サンプルを提供する工程〔各生物学的流体のコンディションは既知である〕；

(b) 工程 (a) の天然サンプルの IR スペクトルを記録する工程；

(c) 工程 (b) の IR スペクトルをマルチパラメータ分析手順に供し、そして既知コンディションへの該サンプルの信頼性のある帰属を確実にする分類パラメータを選択する工程、および

(d) 工程 (c) において得られた分類パラメータを保存する工程、

〔工程 (b) における IR スペクトルの記録は、 $3.0\text{ }\mu\text{m}$ 以下の路長 (path length) を有する測定セルにおいて行われる〕

を包含する、方法。

【請求項 3】

生物学的流体のコンディションを決定するための方法であって、以下

(e) そのコンディションが未知である生物学的流体の天然サンプルを提供する工程；

(f) 該生物学的流体の天然サンプルの IR スペクトルを記録する工程；

(g) 工程 (f) の IR スペクトルをマルチパラメータ分析へ供する工程、および

(h) 該未知サンプルの IR スペクトルのコンディションパラメータを、既知サンプルの IR スペクトルのコンディションパラメータと比較する工程、

〔ここで、工程 (f) における IR スペクトルは、 $3.0\text{ }\mu\text{m}$ 以下の路長 (path length) を有する測定セルの助けを借りて記録される〕

を包含する、方法。

【請求項 4】

工程 (a) および／または工程 (e) における天然サンプルの提供が、前記生物学的流体の均質化および／または前記生物学的流体の粒状成分の除去を包含する、請求項 1～3 の 1 つに記載の方法。

【請求項 5】

工程 (b) および／または工程 (f) における IR スペクトルの記録が $4000\sim 7000\text{ cm}^{-1}$ の波数で行われる、前記請求項の 1 つに記載の方法。

【請求項 6】

工程 (b) および／または工程 (f) における IR スペクトルの記録が、FTIR 分光計

10

20

30

40

50

および／または F T I R 顕微鏡の助けを借りて行われる、前記請求項の 1 つに記載の方法。

【請求項 7】

工程 (b) および／または工程 (f) における I R スペクトルの記録が、3 ~ 12 μ m の路長 (path length) を有する測定セルの助けを借りて行われる、前記請求項の 1 つに記載の方法。

【請求項 8】

1 ~ 100 bar の圧力負荷下の前記測定セルが、1 nm 未満の元の路長 (path length) からの路長偏差 (path length deviation) を示す、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記マルチパラメータ分析手順が、判別 (discriminatory) 分析、ニューラルネットワーク (neural network) またはクラスター分析である、前記請求項の 1 つに記載の方法。

【請求項 10】

前記測定セルが、前記サンプル中の生体分子の還元および／または酸化のための、それと一体化された電極を含む、前記請求項の 1 つに記載の方法。

【請求項 11】

前記生物学的流体が生物の体液である、前記請求項の 1 つに記載の方法。

【請求項 12】

前記体液が、血液、血漿、血清、溶血血液、髄液、尿、唾液、精液、リンパ液、滑液、羊水、涙液、囊胞液 (cyst fluid)、汗腺分泌液および胆汁からなる群から選択される、前記請求項の 1 つに記載の方法。

【請求項 13】

前記生物が、*Bos taurus*、*Gallus gallus*、*Maleagris gallopavo*、*Mus musculus*、*Ovis ammon*、*Rattus norvegicus*、*Sus scrofa* および *Homo sapiens* からなる群から選択される、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記未知コンディションのサンプルが、病理学的もしくは非病理学的コンディションおよび／またはある段階もしくは程度の病理学的コンディションに帰属される、請求項 11 ~ 13 の 1 つに記載の方法。

【請求項 15】

前記病理学的コンディションが、糖尿病、関節炎、増加したコレステロールレベル、貧血、組織破壊、癌、肝炎、腎臓病、心筋梗塞、AIDS、アレルギー、じんま疹、アレルギー性ぜん息、自己免疫疾患、神経変性疾患および TSE からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記病理学的コンディションが、畜産において使用される食品および／または食品添加物によって引き起こされる、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記未知コンディションのサンプルが、特定の細胞タイプ、特定の細菌株または特定のウイルス株の存在に帰属される、請求項 1 ~ 16 の 1 つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学的流体のサンプルの I R スペクトルを記録することによって、生物学的流体のコンディションを決定するための方法に関する。この方法によって、生物学的流体はその天然形態で検査され得る。本発明の方法は、例えば、生物における病理学的コンディションを検出するために使用され得る。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

種々の疾患は、現在、高価であり更に非常に時間のかかる試験を使用することによってのみ、十分な信頼性をもって検出され得る。従って、心筋梗塞（心臓梗塞（heart infarction））のイベントにおいて、診断は、可能な限り短い時間で行われなければならない。心筋壊死（myocardial necrosis）、即ち、限局性心筋領域の破壊（destruction of circumscribed heart muscle region）の突然の開始が存在し、これは、特異的酵素〔CKアイソoenザイム、CPK、半特異的酵素（semispecific enzymes）、LDH（アルファヘン d h）〕の増加に基づく梗塞後1日以内に診断され得る。しかし、多くの場合において、特に、中程度の心筋梗塞は診断が困難であり、その結果、必要とされる処置が提供されず、そして後に、より重篤な心筋梗塞が生じる。これは、適時かつ信頼性のある診断によって予防され得る。更に、現在まで、いくつかの疾患についての信頼性のある結果は、検死を行うことによってのみ得ることができた。

10

【0003】

例えば、プリオン疾患を検出するため〔例えば、BSE（牛海綿状脳症）またはクロイツフェルト・ヤコブ病を診断するため〕の信頼性のある試験は、死後の動物またはヒトにおいてのみ、特に脳切片の顕微鏡検査によってまたは高価な組織化学的抗体試験によって、行われ得る。従って、病原体の蔓延に関する信頼性のある結果は、疾患の発生後にのみ得られ得る。更に、これらの試験は、時間を要し、そして非常に高い人材の相当な適用を必要とし、従って非常にコストが高い。

【0004】

従って、上述の疾患（特に、プリオン疾患）の場合における信頼性のある試験について、ならびに、動物またはヒトにとって生命を脅かすであろうと分析されるサンプルを得るための手順を行うことなく、生存している生物において単純な様式で行われ得る試験〔身体コンディションの多数の臨床的に関連する変化〕についての早急な要求が存在する。

20

【0005】

EP-A-0 644 412は、検査される流体または懸濁液の乾燥サンプルの赤外スペクトルの記録およびマルチパラメータ評価手順（multiparameter evaluation procedures）の使用によるそれらの評価を含む、臨床的に関連する流体サンプルおよびサンプル懸濁液を分析するための方法を開示している。評価手順は、分析されるサンプルをクラス（classes）へ帰属または分類する。評価手順は既知クラスに属するサンプルで較正され（calibrated）、このようにして、未知分類のサンプルをクラスへ帰属させ得る様式で、評価手順のパラメータが適応される。特に、EP-A-0 644 412によれば、赤外スペクトルは、サンプルの乾燥フィルムにおいて記録される。

30

【0006】

しかし、この分光分析法は、サンプルが分析のために乾燥されなければならないという固有の欠点を有し、記録されるスペクトルは、天然でなく（non-native）、均質でない（non-homogenous）サンプルのスペクトルであるということを意味する。従って、サンプル調製のための追加の処理工程が必要とされ、該工程は、より時間を要し、そして該手順の自動化を遂げにより困難にさせ、そしてその天然コンディションのサンプルによってのみ提供される情報が失われる。更に、この方法は、高い分類または帰属エラー率により特徴付けられる。しかし、特に、BSEのような疫学的に重大な病理学的コンディションの場合、陽性または陰性所見の結果を生じる信頼性のある分類が重要である。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、本発明の主題は、例えば生存している動物またはヒトにおける病理学的コンディション（pathological conditions）を検出するために好適でありそして公知のIR方法の欠点を回避する、生物学的流体（例えば、生物における体液）のコンディションを測定するための新規のシステムを提供することである。特に臨床診断のために、多くのサンプルについての要求があるため、本発明に従って、良好な再現性を伴う高サンプルスループ

50

ット (high sample throughput) を可能にする方法を提供することが必要である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

この課題は、特許請求の範囲において特徴付けられる本発明の実施形態によって解決される。

【0009】

特に、本発明は、生物学的流体のコンディショニングを決定するための方法を提供し、該方法は、以下

(a) 該生物学的流体のいくつかの天然サンプルを提供する工程 [各サンプルにおける該生物学的流体のコンディショニングは既知である] ;

(b) 工程 (a) の天然サンプルの IR (赤外) スペクトルを記録する工程 ;

(c) 工程 (b) の IR スペクトルをマルチパラメータ分析手順 (multiparameter analytical procedure) に供し、そして既知コンディショニングへの該サンプルの信頼性のある帰属を確実にする分類または帰属パラメータ (classification or assignment parameters) を選択する工程 ;

(d) 工程 (c) において得られた分類パラメータを保存する工程 ;

(e) そのコンディショニングが未知である生物学的流体の天然サンプルを提供する工程 ;

(f) 工程 (e) の天然サンプルの少なくとも 1 つの IR スペクトルを記録する工程 ;

(g) 工程 (f) の IR スペクトルをマルチパラメータ分析 (multiparameter analysis) へ供する工程、および

(h) 該未知サンプルの IR スペクトルのコンディショニングパラメータを、工程 (d) において保存された該既知サンプルの IR スペクトルのコンディショニングパラメータと比較する工程、

【ここで、工程 (b) および (f) における IR スペクトルは、 $3.0 \mu\text{m}$ 以下の路長 (path length) を有する測定セルの助けを借りて記録される】

を包含する。

【0010】

表現 “生物学的流体 (biological fluid)” は、生物学的に関連する物質を含有する全ての流体を包含する。本発明の方法は、好ましくは、生物の体液に適用される。このような体液の例は、血液、血漿、血清、溶血血液、髄液、尿、リンパ液、滑液、唾液、精液、羊水、涙液、嚢胞液 (cyst fluid)、汗腺分泌液および胆汁である。更に、表現 “生物学的流体” はまた、培養細胞、細菌およびウイルスの懸濁液、ならびに前述の細胞、細菌またはウイルスの培養物から得られる培地上清および溶解物を包含する。前述の細胞、細菌またはウイルスに本発明の方法を適用することによって、これらの生物または病原体は分類され得る。例えば、未知のサンプルは、特定の細胞タイプ、特定の細菌株または特定のウイルス株の存在 (presence) へ帰属される。この様式において、例えば、懸濁液または培地またはいくつかの他の流体中に存在する特定の細菌株が、いくつかの他の細菌株と区別され得る。

【0011】

用語 “生物 (organism)” は、原核および真核細胞のような個々の細胞 (individual cells) 、ならびに多細胞生物、特に植物、動物およびヒトを含む。好ましい生物は、*Bos taurus*、*Gallus gallus*、*Maleagris gallopavo*、*Mus musculus*、*Ovis ammon*、*Rattus norvegicus*、*Sus scrofa* (一般的に：ヒツジ、ニワトリ、ブタ) および *Homo sapiens* からなる群から選択される。

【0012】

表現 “生物学的流体のコンディショニング (condition of a biological fluid)” は、問題の生物学的流体のパラメータの全ての値を含む。これらの流体パラメータは、化学的または物理的性質のもの、例えば、pH、イオン濃度、酸化還元電位などであり得る。好ましい化学的パラメータは、例えば、生物学的物質 (例えば、蛋白質、核酸、脂質および糖質

10

20

30

40

50

）の濃度または存在もしくは非存在を含む。他の化学的パラメータは、問題の生物学的流体中の薬学的に活性な物質の濃度である。“薬学的に活性な物質 (pharmaceutically active substances)” は、例えば、全ての医薬品 (pharmaceuticals) またはそれらの薬理学的に活性な成分ならびに薬物 (drugs) を意味する。本発明の方法によって測定され得る生物学的流体の他の好ましいパラメータは、病原体の存在または非存在である。病原体は、例えば、真核生物（例えば、真菌）または原核生物（例えば、細菌）であり得る。本発明に従って検出され得る他の病原体は、ウイルスおよび蛋白質様病原体 (protein-like pathogens)、特にプリオンを含む。

【0013】

本発明の方法は、例えば、病理学的コンディションを検出するために使用され得、これは、生物の体液サンプルが、コンディション“病気になる (ill)” または“発見事項を伴う (with findings)” あるいはコンディション“病気になる (not ill)” または“発見事項を伴わない (without findings)” と帰属されることを意味する。本発明の方法の助けを借りて検出される得る病理学的コンディションの例は、糖尿病、関節炎、増加した（または、減少した）コレステロールレベル、貧血（例えば、鎌状赤血球貧血）、癌、肝疾患（例えば、肝炎）、AIDS、腎臓病、組織破壊 (tissue destruction)（例えば、心筋梗塞）、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、感染性海綿状脳症 (TSE)（例えば、BSE）、自己免疫疾患、例えば多発性硬化症 (MS)、アレルギー、じんま疹およびアレルギー性ぜん息を含む。病理学的コンディションはまた、動物の畜産（例えば、ブタおよびニトリのもの）において使用される（禁止されている）食品および/または食品添加物によって生じ得る。

【0014】

上述の工程 (a) および/または (e) における天然サンプルを調製するために、体液は、分析前に、例えばそれから粒状成分を除去する (free) ことによって処理される。例えば、IRスペクトルを記録する前に、血液を処理して血清を得る。従って、本発明の方法の顕著な特徴は、他のものの中でも、上述の工程におけるIRスペクトルの記録が均質なサンプルにおいて行われるということである。粒状成分から体液を取り出すことは、例えば、遠心分離および/または好適な細孔サイズの膜を介しての濾過もしくは限外濾過 (ultrafiltration) を包含し得る。

【0015】

例えば、濾過（特に、限外濾過）、遠心分離および/または透析によって、例えば病理学的コンディションの検出の場合、疾患について最適化される、即ち、最大に可能な疾患特異的スペクトル変化を提供する、体液フラクションを得ることが可能となる。この様式において、全ての非常に複雑なスペクトル情報を容易に感知できるほど小さくさせる (reduce) ことが可能であり、このようにして、データ分析の助けを借りて臨床像についての情報を得るという可能性が提供される。複雑性縮小 (complexity reduction) の例は、電極が測定セルと一体化される、電気化学誘導差異分析 (electrochemically induced difference analysis) である。この様式において、印加される電位の助けを借りて、特定の成分、特に生体分子（例えば、蛋白質（例えば、ヘム蛋白質））が、それらの中間点電位 (midpoint potential) に依存して選択的に酸化または還元され得る。この様式で誘導された変化（例えば、電気的または構造的種類の変化）は、認識特徴として使用され得る。従って、印加される電位を変化させることによって、種々の成分を選択的に修飾することが可能である。従って、体液の酸化還元活性成分のみの選択に基づく電気化学誘導差異分析によっておよび電位範囲の好適な選択によって、複雑なスペクトル情報の有利な縮小を達成することが可能となり、検出感度が、生体分子の個々の官能基における変化が測定され得るという事実によって増加される。例えば、赤血球、溶血血漿またはヘモグロビンフラクションの電気化学誘導差異スペクトルによって、蛋白質欠陥、例えば鎌状赤血球において遺伝的に誘導されるアミノ酸差異が、ヘモグロビンにおいて検出されそしてマルパラメータ分析に基づく比較によって疾患として同定され得る。この検出は、ヘモグロビンについて特異的な中間点電位について最適化される。

【0016】

マルチパラメータ分析手順の助けを借りて、全吸収スペクトルおよび誘導差異スペクトルは、補充的様式でまたは個々に、疾患の診断のために使用され得る。

【0017】

しかし、上述の調製工程は、サンプルの“天然”特徴を変化させない。従って、本発明の方法のための分析サンプルは、そこに含まれる成分が、該サンプルが採取された生物中の体液のものと同じであるコンディション（特に、含水量、塩含量、pHなど、および必要に応じて温度に関して）下に存在するということを特徴とする。これは、例えば、問題の体液中に含まれそして該コンディションの測定に必須である生体分子（蛋白質、核酸など）が変性状態にないことを意味する。これは、例えば、IR分析を行う前に流体サンプルを担体材料上で乾燥しなければならないEP-A-0 644 412に記載の方法と対照的である。

【0018】

本発明の方法の好ましい実施形態において、上記に規定の工程（b）および（f）におけるIRスペクトルの記録は、スペクトルの迅速な記録および評価を可能にするフーリエ変換赤外分光法（FTIR）用に設計された分光計によって行われる。FTIR分光計は、例えばIR顕微鏡と連結され得る。IRスペクトルは、透過および／または反射技術によって記録され得る。

【0019】

本発明に従って分析される体液のIRスペクトルの情報内容は、中央IR範囲において特に多い。このために、上記に規定の方法の工程（b）および／または工程（f）におけるIRスペクトルの記録は、好ましくは400～7,000 cm⁻¹そして特に700～1,900 cm⁻¹の波数で行われる。

【0020】

本発明によれば、生物学的流体（例えば、生物の体液）のコンディションが公知である、工程（b）において記録される天然サンプルのIRスペクトルは、工程（c）においてマルチパラメータ分析手順へ供される。このために、問題のIRスペクトルを記録することによって得られた値は、まず、デジタル化される。次いで、デジタル化されたスペクトルを、マルチパラメータ分析手順へ供する。本発明に従って使用され得るマルチパラメータ分析手順は、例えば、多変量データ分析法（multivariate data analysis methods）、例えば線形判別分析（linear discriminatory analyses）、ニューロナルネットワーク（neural networks）およびクラスター分析であり、これらは、ソフトウェアプログラムとして市販されている。

【0021】

本発明の方法の工程（c）において、マルチパラメータ分析手順は、コンディションが既知である生物の体液の天然サンプルのIRスペクトル中に含まれる情報を処理することによって、作成、即ち校正（calibrated）される。マルチパラメータ分析の手段によって、既知のコンディションへの問題のサンプルの信頼性のある分類または帰属を確実にする分類パラメータが、IRスペクトルのデータ記録から得られる。本発明によれば、マルチパラメータ分析手順を校正するために、例えば5～1000および好ましくは50～300の、いくつかのサンプルIRスペクトルを、例えばコンディションAを示すことが既知である基礎的な（underlying）体液を用いて、マルチパラメータ分析手順によって分析する。これに対応して、基礎的な体液が例えばコンディションBを示す同様に非常に多数のIRスペクトルを分析する。マルチパラメータ分析手順を校正するために必要である1コンディション当たりのスペクトル数は、特に、種々のコンディションについてのスペクトルがそれら自体の間で異なる程度に依存する。しかし、一般的に、1コンディション当たり相当に多数の（例えば100を超える）スペクトルでマルチパラメータ手順を校正することが好ましく、何故ならば、分類エラー率は、マルチパラメータ分析手順のために利用可能なデータセットのサイズに従って減少するからである。上述のように、IRスペクトルのマルチパラメータ分析は、好ましくは、ソフトウェア制御データ処理（software-controlled data processing）の助けを借りて行われる。得られた分類パラメータを好まし

10

20

30

40

50

くは電子データキャリアに保存することによって、次いで、該パラメータは、そのコンディションが未知である体液のサンプルのIRスペクトルの対応データ記録との比較に利用可能となる。

【0022】

この様式で、本発明の方法によって、未知コンディションの体液の天然サンプルは、測定され、マルチパラメータ分析手順へ供され、そして、未知サンプルのIRスペクトルのコンディションパラメータを、既知サンプルのIRスペクトルの既得られそして保存されたコンディションパラメータと比較することによって、コンディション、例えばコンディションAまたはコンディションBへ帰属される。当然ながら、参照コンディションの好適な選択によって、本発明の方法により、校正シリーズ (calibration series) (例えば、コンディションA～Zに対応する0～n濃度単位の物質の濃度) をセットアップ (set up) して例えば定量的な決定を許容することもまた可能である。従って、本発明の方法はまた、マルチパラメータ分析手順の好適な校正によって、例えばコレステロールレベルがどれくらい正常値からはずれているかまたはどの段階の癌が存在するかによって、病理的コンディションの程度または段階についての情報を提供する。

【0023】

上記で定義された方法を行うために好適な装置は、例えば、天然の流体サンプルのFTIRスペクトルを記録するために設計された、FTIR分光計、関連のポンプ (related pumps) および好適な測定セルを備える分析装置である。本発明によれば天然サンプルのIRスペクトルが記録されるので、上記で定義される工程 (b) および/または工程 (f) における記録は、1～30 μm 、特に3～12 μm そして最も好ましくは10 μm を超えない路長 (path length) を備える測定セルの助けを借りて行われる。水性サンプルのための透過セルについての最適路長 (optimal path length) の選択は、例えば、Rahmelow, K. およびHuber, W. (1997) によってAppl. Spectrosc. 51, 160-170において記載される。本発明に従うIRスペクトルの記録のためには短路長 (short path length) が必要とされ、特に何故ならば、光路長 (optical path length) が12 μm を超える場合には生物学的流体中に存在する水が全吸収 (total absorption) の範囲を増加させるからであり、そして30 μm を超えると情報内容が本発明の方法について非常に少なくなるからである。

【0024】

本発明の方法のために好適な光学材料 (optical materials) は、一般的に、示される波数範囲または部分範囲におけるIRに対して透過性である全ての材料、好ましくはフッ化カルシウム (CaF_2)、フッ化バリウム (BaF_2)、セレン化亜鉛 (ZnSe)、ゲイ素 (Si)、ゲルマニウム (Ge) および薄いポリマーフィルムである。必要に応じて、該材料は、例えば、バリレン、PTFEまたはPEの、薄い水不溶性層でコーティングされ得る。この様式において、特別な性質が、短路セル (short-path cell) に付与され得る。例えば、このような材料は、窓材料またはセル材料と生物学的サンプルとの間の相互作用を減少させるため、あるいは水溶性窓材料を水含有サンプル溶液から隔離するために使用され得る。これは、光学材料の幅広い選択、そして従ってより広範囲のスペクトル範囲を提供する。従って、例えば、水溶性の臭化カリウム (KBr) もまた、窓材料として使用され得る。

【0025】

更に、電極が、例えば微細構造化ネットワーク (microstructured networks) の形態で、セルと一体化されて、電気化学誘導差異分析 (差異分光分析 (difference spectroscopy)) が可能となり得る。このような測定セルは、例えば、Moss, A. D., Nabeidryk, E., Breton, J. and Mantele, W. (1990) Eur. J. Biochem. 187, 565-572によって記載される。

【0026】

流体用のワンピース短路セル (one-piece short-path cells) の以下の3実施形態が、分析方法のために使用され得る。

【0027】

10

20

30

40

50

タイプ1：ワンピース微細構造化フロースルーセル (one-piece microstructured flow-through cell)

このようなセルは、市販されており、以下の特徴を有する：

- － 高圧耐性（例えば、 $10 \sim 100 \text{ bar}$ ）。これは、フロースルーセル（特に、 $1 \sim 15 \mu\text{m}$ の範囲の路長(path length)を有するもの）の充填の間の高フロー耐性 (high flow resistance) の場合に有利である；
- － 少量の充填容積 ($0.05 \sim 3 \mu\text{L}$)；従って、極めて非常に少量のサンプル量が好適である；
- － 自動化高スループットが可能である；セルの充填およびリンスが、非常に迅速に達成され得る；
- － 迅速な圧力緩和 (pressure relaxation) ($< 10 \text{ ms}$)；高サンプルスループットのために必要とされる；
- － このようなセルは、変動する圧力条件にもかかわらず、サンプル分析の間、一定の路長 (path length) を保持する。偏差は、IR分析の検出限界未満のままであり、従って、干渉シグナルを生成しない。従って、本発明の方法の再現性は、非常に改善される；
- － 微細構造化電極 (microstructured electrodes) との一体化が可能である。

【0028】

IR測定セルと電極との一体化、例えばワンピースマイクロフロースルーセルと微細構造化電極との一体化によって、本発明の方法に、以下の更なる利点を与えることが可能となる：

- － 液体中に酸化還元活性成分を有するサンプルについての複雑性縮小 (complexity reduction) が、達成され得る。全スペクトルおよび詳細な（高分解能）電気化学誘導差異スペクトルに基づくデータ分析は、新たな（更なる）スペクトル情報を提供することを可能にする。
- － 微細構造化電極とセルとの一体化によって、スキャン可能な電位インターバル (scanable potential intervals) が、電位インターバルに特異的なスペクトル変化のために評価され得る。
- － 特定の疾患について最適化された最大の疾患－特異的スペクトル変化を伴う電位範囲を評価することが可能である。

【0029】

タイプ2：ワンピース微細構造化拡散混合セル (one-piece microstructured diffusion mixing cell)

このような測定セルは、先行技術から公知であり、そして以下の特性を有する：

- － セルは使用後に破棄されるので（単回使用セル）、洗浄が必要でない；
- － 一定の路長 (path length)；
- － 必要とされるサンプル容積が少量である ($< 1 \mu\text{L}$ 、例えば $50 \sim 200 \text{ nL}$)；
- － 迅速な圧力緩和および高圧力耐性は、以下のために必要とされない；
- － 単回使用の使い捨てセルまたはアレイが使用される（時間を要するリンスおよび洗浄が必要でない；病源性生体材料（例えば、セーフティクラス2と帰属されたサンプル）を用いての作業の場合、取り扱いが容易である；
- － 充填が、毛細管力 (capillary force) によって生じる；
- － “ポイントオブケア (point-of-care)” 使用に好適である。

【0030】

タイプ3：ワンピース毛細管力短路セル (one-piece capillary force short-path cell)

このタイプの測定セルは、DE 197 39 126に記載され、そして以下の特性を有する：

- － 少量のサンプル容積 ($< 5 \mu\text{L}$)；
- － 迅速な緩和および高圧力耐性は、以下のために必要とされない；
- － セルが単回使用の使い捨てタイプである；
- － 充填が、毛細管力によって生じる；

10

20

30

40

50

一 微細構造化電極との一体化が可能である。

【0031】

本発明の方法の好ましい実施形態によれば、記録および評価の工程は、1機器1日当たり、数千（例えば、5000）の記録および評価という高スループットのために完全に自動化される。この目的のために、本発明の方法は、個々の部品（components）（例えば、ポンプ、サンプリングループ（sampling loops）、コントロールバルブ、ミキサーなど）が非常に少量の容積および高圧（例えば、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）において遭遇するもの）での操作のために設計されている、測定装置の助けを借りて行われ得る。これら個々の部品の制御は、好ましくは、コンピュータによって達成される。1～15 μm の路長（path length）を有するマイクロフローセル（microflow-through cell）と連結されたHPLC部品の使用は、好ましくは $<20 \mu\text{L}$ の非常に少量のサンプルを必要とする。より好ましいのは、1～10 μL および特に5 μL のサンプルを必要とするフローシステムである。

【0032】

上記に示される方法を実施することにおいて、特にHPLC部品を使用する場合、1～100 barの高圧が、測定セルが充填される速度に依存して発生される。本発明の方法の再現性、および従って検査される生物学的流体のコンディションの信頼性のある分類を確実にするために、スペクトルの記録の間の測定セルは、セルの充填およびリンスの間に変動する高圧負荷にも関わらず、好ましくはもとの路長（path length）から1 nm未満の路長偏差（path length deviation）を示す。

【0033】

特に、本発明の方法は、例えば上述のフローシステム装置において、以下に行われる。ポンプをランさせながら、サンプル（例えば、血清、血漿など）が、サンプリングループバルブを介して、輸送媒体（transport medium）（例えば、水または水性緩衝溶液）へ供給され、そして次いで、FTIR測定セルへ移される。一旦サンプルが測定セルに入ると、フローが停止され、そしてサンプルのFTIRスペクトルが記録される。次いで、セルが輸送媒体でリンスされる。サンプリングループバルブの使用によって、サンプリングループは、記録が行われている間でさえ、再充填され得る。この様式において、サンプルスループットは、ほとんど記録時間の持続時間（FTIR記録の場合、一般的に15～30秒）によってのみ制限され、その結果として、システムは、多数のサンプルについての自動化のために特に十分に好適である。

【0034】

上記で記載するように、上記システムは、本発明の方法の手動、半自動ならびに完全に自動の実施について好適である。自動化された高サンプルスループットの場合、上記記録システムは、好ましくは、コンピュータ制御され、そしてHPLC—適合性部品が備えられる。このようなシステムにおいて、サンプルは、例えば、標準化マイクロタイタープレートから供給され得る。本発明の方法の自動化バージョンにおいて、IRスペクトルの記録は、好ましくは、上述のワンピース微細構造化フローセルの助けを借りて行われ、この中へ、必要に応じて、生物学的流体の電気化学誘導差分析を実施するための電極が一体化され得る。

【0035】

生物の体液のコンディションを測定するために本発明の方法の重要な適用は、例えば体液の濃度または組成、例えばヒト、ブタおよびBos taurus（ウシ）の血液または血清に対するブタまたはウシ畜産において使用される動物飼料中の病原体または禁止されている添加物の影響を測定することからなる。この場合における具体例は、体液（例えば、Bos taurus（ウシ）の血液または血清のような体液）中のプリオンの、存在または非存在の影響の検出、あるいは濃度の測定である。

【0036】

従って、本発明の方法の1実施形態は、病原体、物質または活性成分の直接検出ではなく、体液（例えば、血液カウント／血液組成）の組成〔これは、例えば、罹患した動物／

10

20

30

40

50

ヒトの代謝に影響を与える、自己免疫反応（例えば、多発性硬化症）、食品添加物、アミロイド（アルツハイマー病）またはプリオン（TSE）によって変化される」の認識に基づく迅速な試験を構成する。本発明によれば、BSE病原体の直接検出ではなく、体液組成（例えば、血液カウント）〔該組成は、罹患した動物の代謝に影響を与えるプリオンの存在によって修飾される〕の認識に基づくBSEについての迅速な試験が、開発され得る。

【0037】

死んだ動物において今まで行われていた試験とは対照的に、本発明の方法は、生存している生物において行われ得、そして更に、顕著な手順を含まない。例えば、1試験当たり概算で6〜8時間が必要とされる現在入手可能であるBSE試験と比較して、1装置1日当たり5000測定までを含む本発明の方法は、非常に迅速に行われ得る。高い労働コストおよび大量の費用を回避することによって、かなりのコスト削減が、個々の分析について達成され得る。

【0038】

サンプルを既知コンディションへ帰属させそして未知サンプルを比較するために、本発明に従って使用されるマルチパラメータ分析手順は、定期的に、修飾コンディションへ適応されそして一定コンディションについて最適化され得る。例えば、例えば従来の抗体試験（抗体は、病原体の特定の形態のみに反応し、修飾された病原性変異体には反応しない）に従順でない（not amenable）病原体の新規変異体の発生の場合、マルチパラメータ分析手順（例えば、ニューロナルネットワーク）は、修飾されたコンディションに適応され得る。これは、偽陰性試験結果を回避する。偽陰性試験結果は、非常に特異的な抗体試験において病原体の多形性の結果として頻繁に生じ、何故ならば、それによって病原体の新規のイソフォーム（isoform）が頻繁に認識されないためである。対照的に、本発明の方法は、病原体の多形によって悪影響を受けない。

【0039】

その上、特にHPLC部品が使用される場合に、極めて非常に少量のサンプル（ $< 20 \mu\text{L}$ ）が必要とされる。

【0040】

更に、それらの天然状態のサンプルの分析は、乾燥サンプル（例えば、サンプルの乾燥フィルム）のIR分析を包含する方法を行うよりも、遥かに信頼性の高い分類、即ち、偽陽性および偽陰性試験結果の回避を生じさせる。従って、特に、BSEのような疫学的に顕著な病原性コンディションの認識において、遥かに低いエラー率を達成することが可能である。

【0041】

特に、本発明の方法は、バイオフィーム（biofilms）において行われるIR分析を包含する先行技術方法に対して以下の利点を有する：

一 水は、生体分子の空間構造（spatial structure）の安定化において必須の役割を果たす。天然状態において、可溶性生体分子は、コンフォーメーション安定化様式で、イオン性または極性官能基と相互作用する水和シェル（hydrate shell）によって囲まれている。該分子構造の内部においても、水は、安定化および形状化（shaping）様式で、生体分子の空間構造に対して水素結合によって作用する。乾燥バイオフィームの形態での脱水は、この場合、隣接する分子との分子間相互作用によって重要な（critical）構造修飾を生じさせる得る。

【0042】

一 体液の天然コンディションおよび従って溶解化成分の天然コンフォーメーションは、本発明の方法について効果がある乾燥バイオフィームの分析について効果がない。例えば、疾患または体液コンディションの変化は、蛋白質のコンフォーメーション変化によって引き起こされ得る。この場合、差異（differentiation）は、天然コンフォーメーションと病原性コンフォーメーションとを比較することによってのみ検出へと至り得る。乾燥バイオフィームにおいて、天然または病原性コンフォーメーションは、脱水によって変化

10

20

30

40

50

または破壊され得、これは識別 (differentiation) をより困難または不可能にするであろう。

【0043】

— バイオフィームは、フィルム厚みまたは外部層からの距離に依存して、異なる脱水状態を示す。フィルム内部において、脱水は端 (edge) よりもより少ない程度まで進行している。この理由は、内部からの水は、その上の層を介しての拡散によって徐々にのみ外部に到達し得るということである。

【0044】

— サンプル中の異なる脱水状態は、隣接する原子または官能基との、異なる、または異なる程度の、分子内および分子間相互作用へ至り、その結果、バンドシフト (band shift) (10) が生じる (吸収最大値が、別の波数へ向かってシフトする)。これは、官能基について特徴的な吸収ピークおよび吸収係数 (extinction coefficient) が脱水の程度に依存することを意味する。従って、サンプル中の種々の脱水状態は、ラインブロード化 (line broadening) を生じさせ、何故ならば、多くのピークが、互いに対して僅かにシフトするためであり、これは、不都合なことに、より少ないスペクトル情報を提供する。

【0045】

— 更に、分類目的のために使用されるサンプルは、多変量データ分析の作成 (校正) において使用されるデータ記録についての場合と同一程度の脱水を示さなければならず、そうでなければ、種々のバンドシフトは、明白なバンド分類 ("帰属") を妨げるであろう。

— 乾燥処理のため、バイオフィームは、不均質な組成を有する。これは、分析再現性の低下を引き起こす。

— 良好な再現性および低い分類 ("帰属") エラー率のために、校正データ記録と一致して、以下のパラメータが、バイオフィームの調製において最適化されなければならない：

- 乾燥持続時間
- 乾燥勾配 (drying gradient)
- 乾燥温度
- 適用されるコーティング量
- 適用されるコーティングの厚み
- 担体材料 (湿潤 (wetting))
- フィルム表面 (例えば、湾曲 (curvature)、荒さ (roughness) など) (透過/反射/スキャタリング関係について重要)
- コーティング方法 (例えば、適用間で、単一の厚いコーティング適用と乾燥段階を伴ういくつかの薄い適用との間の差異が存在する)。そうでなければ、劣った再現性および高い分類エラー率が生じるだろう。

【0046】

— バイオフィームの分析に関する上述の問題は、高価で、コスト集約的な (cost-intensive) 測定 (metering)、熱制御および調節技術によってのみ幾分制御され得る。従って、先行技術方法は、広範囲に及ぶ使用または "ポイント-of-care" (point-of-care) (40) 使用のために好適でない。

【0047】

— また、より良好な再現性のために、分類されるサンプルのスペクトルの記録は、校正データ記録についてのものと同じの記録技術によって行われるべきである。しかし、乾燥バイオフィームのスペクトルを記録するために、多くの技術が、広範囲の使用、例えば透過、反射または拡散反射技術において存在し、これは、十分な精度で比較することができないデータを提供する。

【0048】

— 電気化学差分析は、酸化還元-活性成分がそれらの天然コンフォーメーションを依然と保持する場合にのみ意味があり、酸化還元プロセスの結果として、それらは、特徴的 (50)

で高度に特異的な構造変化を受ける (Moss, A. D., Nabadryk, E., Breton, J. and Mant ele, W. (1990) Eur. J. Biochem. 187, 565-572を参照のこと)。しかし、バイオフィルムにおいて、分子は、脱水状態であり、その結果、ここで“天然”サンプルのことは語る ことができない。

【0049】

一 スペクトル校正について、校正物質が、大抵の場合においてバイオフィルムに添加される。このような校正は、本発明の方法に必要でない。

【0050】

本発明の方法は、上記において説明されたサンプル調製の問題によって影響を受けない。大抵の体液についての調製工程 (少しでも必要な場合) は、標準化され、そして更に、関連の生物において、体液中に溶解された物質は、大抵の場合、同様の濃度で存在し、その結果、一方では体液の天然特徴は保持され、そして他方ではサンプルの直接比較が可能である。必要に応じて、参照測定セルの路長 (path length) へ、使用される測定セルの路長 (path length) に関するデータを標準化する必要がある。従って、本発明の方法は、分析技術の良好な再現性と組み合わせられて、特定の疾患 (または生物学的流体のコンディション変化) に関する多変量パラメータ記録を確立するという可能性のために、広範囲の使用に著しく好適である。

【0051】

本発明の方法は、例えば、以下の通り、図1に示される装置を用いて行われ得る：

一 サンプルは、手動で (半自動化システム) またはマイクロタイタープレート (1) から (完全な自動化システム) 供給され得る。

【0052】

一 供給から、サンプルは、注入バルブ (2) へ導入される。

【0053】

一 マイクロタイタープレート (1) からのサンプルは、引き続いて、ポンプ (3) を介して処理される (taken up)。

【0054】

一 注入バルブ (2) を介して、サンプルが、フロースルー測定セル (flow-through measuring cell) (4) へ導入される。

【0055】

一 注入バルブ (2) を切り替えることによって、サンプルは、輸送媒体 (transport medium) (5) (例えば、水または緩衝水溶液) へ供給され、次いでフロースルー測定セル (4) へ導入される。

【0056】

一 輸送媒体 (5) は、追加のポンプ (6) (好ましくは、HPLCポンプ) によって駆動される。

【0057】

一 サンプルが測定セル (4) にある場合、輸送媒体 (5) の流れは、例えば廃棄容器 (waste container) (8) へ、制御バルブ (7) によってコースを変えられ、従って測定セル (4) を介しての流れが停止する。

【0058】

一 測定セル (4) は、IR分光計 (または、IR顕微鏡) と一体化され、それによって1以上のIRスペクトルが記録され得る。記録の間、測定セル (4) を介しての流れは存在しない。

【0059】

一 IRスペクトルを記録するために、IR光源 (9) からの光が、サンプルを通過され、そして検出器 (10) によって検出される。

【0060】

一 サンプルの還元または酸化が必要に応じて行われる。異なる印加電位について、少なくとも1つのIRスペクトルが、各場合において記録される。

10

20

30

40

50

【0061】

一引き続いて、制御バルブ（7）がリセットされ、そしてサンプルは、輸送媒体（5）を用いてセル（4）から廃棄容器（8）へ完全にリンスされる。

【0062】

一 必要に応じて、サンプルが流される、セル（4）、サンプリングループ（sampling loop）およびラインが、洗浄溶液（cleaning solution）（11）（例えば、SDS／6 M グアニニウムヒドロクロリド）で洗浄される。洗浄溶液（11）は、好ましくは、追加のポンプ（13）の使用によって、制御バルブ（7）と第1注入バルブ（2）との間の第2注入バルブ（12）を介して導入される。

【0063】

一 原則として、リンス後〔セル（4）が輸送媒体（5）で完全に充填される〕、停止状態での参照スペクトル（reference spectrum）が記録される。この目的のために、輸送媒体（5）は、一定のままである参照として役立つ。

【0064】

一 必要に応じて、注入バルブ（2）はサンプルスペクトルの記録前、間および／または後に切り替えられ得、そしてサンプリングループは再充填され得る。好ましくは、注入バルブ（2）は、記録の前に切り替えられそして再充填される。この様式において、サンプルスルーブットは、記録の持続時間（一般的に、15～30秒）によってほとんど独占的に制限され、従ってシステムは多数のサンプルの自動化に好適である。

【0065】

一 得られたIRスペクトルの評価は、多変量データ分析によって行われる。

【0066】

一 最後に、サンプルは、多変量データ分析の群へ帰属される。

【0067】

システムは、好ましくは、HPLC部品から作製される。

【0068】

以下において、本発明は、非限定的な実施例によってより詳細に説明される。

実施例

ヘモグロビンの電気化学誘導差異分析

正常なヒトヘモグロビン（Hb_A）および鎌状赤血球貧血ヘモグロビン（Hb_S）の溶液を調製した。その電気化学誘導スペクトルを、短路セル（short-path cell）においてFTIR分光計の手段によって記録した。差異スペクトルを図2に示す。2つのスペクトルは、特定の吸収範囲において良好な一致（agreement）を示す。しかし、他の範囲において、鎌状赤血球貧血ヘモグロビンについて特徴的な明確な差異が認識可能である。従って、本発明の方法は、例えば臨床分野における診断目的について、迅速かつ普遍的な有用な検出方法を提供する。何故ならば、電気化学誘導差異分析は、生物学的流体において全ての酸化還元活性物質に適用可能であるからである。

【0069】

ヒト血清のFTIR分析

全吸収スペクトルを、短路フロースルーセル（short-path flow-through cell）（路長（path length）6 μm）の手段によって記録した（図3）。

【0070】

IRスペクトル（二次導関数）の再現性を、同一の測定システムを使用することによって、ヒト血清において検査した。この目的のために、同一患者由来の5つのサンプルを、測定装置へ注入し、そしてスペクトルを記録した。図4におけるスペクトルは、バイオフィルムの分析によって達成不可能である顕著な再現性を示す。

【0071】

図5Aは、また上記の短路フロースルーセル（short-path flow-through cell）を使用して記録した、5つの異なるヒト血清のIRスペクトル（二次導関数）を示す。理解されるように、種々の患者由来のサンプルのスペクトルは、特定範囲において明確な差異を示す。

10

20

40

50

これは、スペクトルを重ねた場合（図5B）、例えば $1680 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ の範囲において特に明白である。

【0072】

多発性硬化症に罹患する患者由来のヒト髄液および血清サンプルのFTIR分析
広範なヒトデータバンクから、多発性硬化症に罹患する患者由来の髄液および血清のサン
プルを、上述の方法によって分析した。凍結保存していたサンプル—新鮮なサンプルもま
た使用され得る—を、短路セル(short-path cell)を備える装置中に、解凍、流体状態で
分析に供した。最も単純な場合、これらのサンプルは、直接使用され得る。最適化は、サ
ンプルの好適な前処理によって達成され得る。ケモメトリック(chemometric)方法によ
る引き続いてのデータ評価のために、記録された吸収スペクトルは直接使用され得、また
はその二次導関数で使用され得る。 700 cm^{-1} までおよび 3000 cm^{-1} まで記録され
たスペクトルのスペクトル範囲を拡大することは、これが情報量を増加させるので、スペ
クトル評価のために有用であるかもしれない。

10

【0073】

髄液の実施例についての、図6(A)および6(B)は、多発性硬化症に罹患するかまたは罹患しない患者についてのスペクトルを示す。

【図面の簡単な説明】

【0074】

図は以下を示す。

【図1】図1は、本発明の方法を実施するために好適な装置の概略図である。

20

【図2】図2は、正常なヒトヘモグロビン(Hb_A)および鎌状赤血球質ヘモグロビン(Hb_S)の電気化学誘導FTIR差異スペクトルのグラフィック図である。

【図3】図3は、ヒト血清の全IR吸収スペクトルのグラフィック図である。短路フロー
スルーセル(short-path flow-through cell)が使用された(路長(path length): 約 $6 \mu\text{m}$)。

【図4】図4は、ヒト患者の血清の5つのIRスペクトルの二次導関数のグラフィック図である。

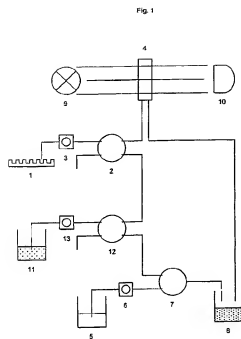
【図5】図5(A)は、5人の異なるヒト患者の血清のIRスペクトルの二次導関数のグラフィック図であり、そして(B)は、 $1680 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ の波数範囲における互いに重ね合わされた(A)のスペクトルを示す。

30

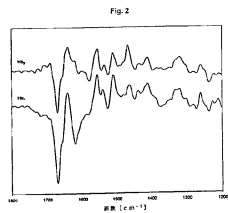
【図6】図6(A)は、多発性硬化症を有するかまたは有さない患者由来の髄液サンプルの吸収スペクトルを示し、そして(B)は、これらの吸収スペクトルの二次導関数を示す。

。

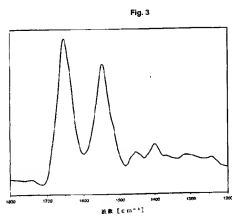
【図 1】



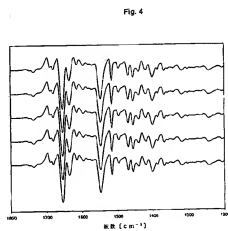
【図 2】



【図 3】

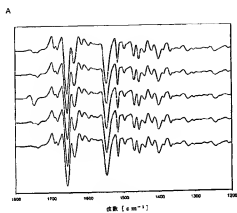


【図 4】

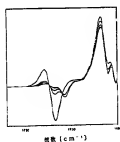


【図 5】

Fig. 5

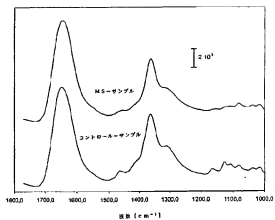


B



【図 6 A】

Fig. 6A



【図 6 B】

Fig. 6B

